

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461670

研究課題名(和文) エクリン汗免疫異常の改善による掌蹠膿疱症の病態制御

研究課題名(英文) The pathogenesis of palmoplantar pustulosis and the eccrine sweat innate immune system failure

研究代表者

村上 正基 (Murakami, Masamoto)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20278302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：掌蹠膿疱症の病態にエクリン汗腺が関与しているという事実を基に、病変部の水疱内容中に病態に関与すると思われる物質の同定を試みた。この結果、病変部水疱内に含有されるhCAP18/LL37がその後に引き続き生じる手掌足底部の炎症性病変の形成に寄与することがqRT-PCRを用いた炎症性サイトカインの発現様式の検討により明らかとなった。このことから本疾患が単なる水疱膿疱形成性病変ではなく、自然免疫系抗菌ペプチドの発現異常が関与する病態であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Based on the reported finding that eccrine gland of the lesion could be involved in the pathogenesis of palmoplantar pustulosis (PPP), we searched suspected materials which contributed to the pathogenesis of PPP in lesion vesicles. As one of the candidates, hCAP18/LL37 expression in the vesicles was nominated, and we showed that it contributed to subsequent lesion inflammation with upregulation of inflammatory cytokines. According to this finding, PPP could be regarded as a disease which was caused by abnormal antimicrobial expression, innate immune system failure.

研究分野：皮膚科学

キーワード：掌蹠膿疱症 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

掌蹠膿疱症は手掌・足底に生じる無菌性膿疱を主徴とする慢性・再発性・難治性皮膚疾患で、1958年に本邦で本疾患概念が受け入れられ、以後今日まで多数の報告がなされているものの、未だ本疾患の本態・原因については明らかではない。病巣感染説(扁桃起源説)・金属アレルギー説などが報告されているが、これらの原因と推察される物質除去を行っても多数の再発患者が存在し、本疾患が一元的に説明できないことを示している。現時点で本疾患に対する一般的な加療を施行しても、実際の現場ではなかなか完治を見ることが難しく、診療現場での治療法はこの20年来変わっていない。多数の罹患者からの早期病態解明および治療法の開発を望む声は非常に大きい。

申請者は、掌蹠膿疱症患者から得られた病理組織・免疫組織化学、手掌足底部のダーモスコープ所見、病変部での発汗量の低下、水疱内容に汗腺由来 dermcidin 及び hCAP-18/LL37 の発現を確認したことなどから、本症の病変は表皮内汗管で生じることを報告した (Murakami M et al, J Invest Dermatol. 2010)。その後、膿疱を形成する好中球内の hCAP-18/LL37 は、通常の fragmentation のパターンと異なり、酒さで見られる異常現象 (Yamasaki K, Murakami M et al. Nat Med. 2006) と同様に強い炎症性角化局面を生じる可能性があること (第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、シンポジウムにて報告)、病変部局所での IL-17 及び IL-8 mRNA などが高値を呈し、血清中の IL-17 関連サイトカインの発現パターンは尋常性乾癬患者の報告と異なること (Murakami M et al, Exp Dermatol. 2011)、病変部組織での TLR 発現様式は、既報の尋常性乾癬での発現様式と異なることを見出した。以上より、掌蹠膿疱症が、エクリン汗、エクリン汗内抗菌ペプチド、IL-17 関連サイトカイン、及び TLR 発現様式などが関連しあって、その病態を構成することが次第に明らかとなった。

2. 研究の目的

難治性皮膚疾患である掌蹠膿疱症は表皮内汗管を病変の主座とすることが明らかとなり、免疫学的エクリン汗システム異常によるものであることが判明したことを踏まえ、本疾患の実験モデルの作成を試みる。モデル作成後は、これを用いて現在の治療内容を含めた治療候補物質による病態制御を試みる。

3. 研究の方法

(1) 正常手掌部・非手掌部からの角化細胞を用いた3次元培養表皮(LSE)及びエクリン汗培養細胞(NCL-SG3)を用いて、掌蹠膿疱症患者

者病変部水疱内容および血清を作用させ、健康人汗及び血清による反応性との比較を行い、自然免疫系の異常の検索を試みる。

(2) 掌蹠膿疱症の増悪物質と見なされる喫煙：ニコチン、細菌感染：S.aureus 及び S. epidermidis を作用させたときのプロファイルと比較・検討を試みる。

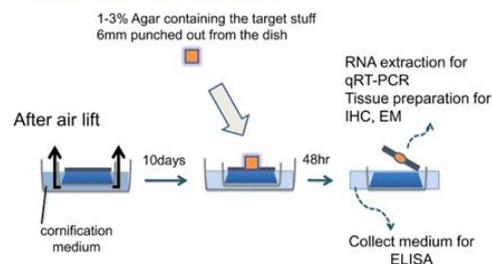
(3) LSE を用いて掌蹠膿疱症の病態と同様なサイトカインプロファイルを誘導し、これに対して治療オプション候補物質を作用させて、IL-17 関連サイトカイン(IL-23, IL-8, IL-1 など)の発現抑制を検討し、治療オプションとしての効果を評価する。

4. 研究成果

(1) 正常手掌部・非手掌部からの角化細胞(同一個体由来)を用いた LSE の構築を行った。部位の違いによる細胞分化、増殖、角化動態の差異をこの LSE で表現することが可能かどうかをみるために、細胞抽出液より得られた RNA に対する qRT-PCR、及び組織切片作成後に行った免疫組織化学的検索により検討を行った。ロリクリン、インボルクリン、ケラチン K5, K10, K14, Ki67(MIB1) 細胞陽性率については、両者間に明らかな発現様式の差異を認めることができなかった。従って、エクリン汗装置由来細胞の含有の差はこれらに影響を及ぼす可能性が低いことが示唆された。

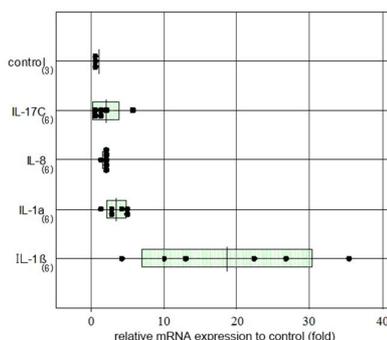
(2) 微量サンプルによる角化細胞への刺激実験砲：LSE を用いた被刺激実験法の確立。掌蹠膿疱症患者からの手掌・足底部の水疱/膿疱は非常に微量であるため、通常の二次元培養ケラチノサイトで刺激実験を行うことは困難である。直接検査物を添加すると直ちに乾燥し、持続刺激が困難になることから、適切な vehicle を検討したところ、アガロースゲルを用いて検査物を被覆あるいは含有させることにより、良好な結果を得ることが可能であることが明らかとなった。

Applying the cylinder gel containing the target stuff onto LSE

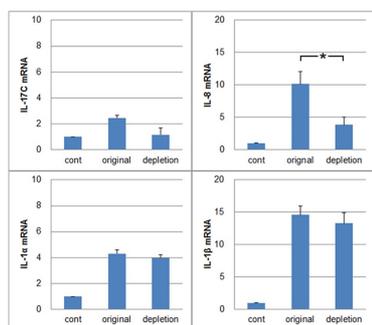


(3) 掌蹠膿疱症患者水疱による表皮角化細胞(LSE)への影響の解析
患者病変部より採取された水疱内容を上

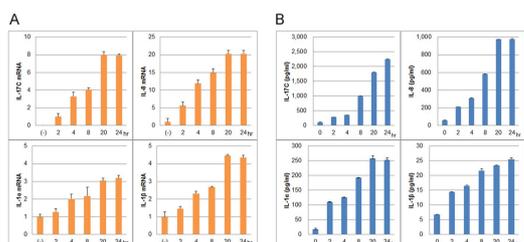
記 LSE 刺激システムに乗せて検討を行った。qRT-PCR により mRNA 発現を検索したところ、水疱内容成分は炎症性サイトカイン (IL-17, IL-8, IL-1 α , IL-1 β) の誘導に寄与することがあきらかとなった。



この現象を引き起こす候補物質として、hCAP-18/LL37 を考えた。抗 LL37 抗体を用いて抗体カラムを作成し、これを用いて水疱内容から内因性の hCAP-18/LL37 を depletion し、dep-VF として再び LSE に作用させた。Depletion 後のサンプルでは特に IL-8 mRNA の誘導が減少し、水疱内 LL37 が寄与していることがあきらかとなった。



水疱後に引き続いて生じる掌蹠膿疱症の炎症誘因として、水疱内 LL37 濃度の上昇が強く示唆された。そのため、水疱内容に含まれる hCAP18/LL37 の蛋白量を dot blotting / densitometry により検討し、おおむね 3 μ M と確認をした。この濃度を用いて LL37 が表皮ケラチノサイトに実際に炎症性変化を引き起こすことが可能かどうかを検討した。二次元単層培養系ケラチノサイトに LL37 合成ペプチドを添加し、経時的に IL-17, IL-8, IL-1 α , IL-1 β mRNA 及びタンパクレベルを qRT-PCR 及び ELISA にて検討した。結果を以下に示す。



炎症性サイトカインの誘導を確認することができたことから、水疱内 hCAP18/LL37 が、水疱が持続した後に生ずる膿疱形成と炎症状態を誘導する原因物質の一つであることが明らかとなった。

LSE に対して、ニコチン抽出液及び S.aureus 及び S. epidermidis (heat inactivated bacteria component) を添加し、同様に炎症性サイトカインの動態を観察した。qRT-PCR にて明らかな upregulation が確認できなかったことから、表皮角化細胞に対するこれら物質の直接的病態への関与の可能性が低いことが示唆された。しかしながら、既報論文では二次元単層培養系において炎症性サイトカインが誘導されているという報告があり、二次元単層培養系と LSE の最大の相違点であるところの角層バリアの影響が考慮される。従って、この角層バリアが障害を受けている場合に関与がある可能性について、さらに追加実験を行い、検証をする必要が生じた。

今回の研究より、掌蹠膿疱症の病態に関する新たな知見を得ることができた。特に掌蹠膿疱症の水疱・膿疱及びこれに引き続き生じる炎症性変化に、自然免疫系抗菌ペプチドの発現が関わっていることが明らかとなったことで、本疾患の発症メカニズムが一元的なものでない可能性が高くなった。しかしながら、今回の研究期間で、そもそもの抗菌ペプチド発現異常の原因とこれに対する治療オプションの検討にまでは残念ながら至ることができず、現在、この点に関して研究継続としている。

しかしながら、本研究成果は掌蹠膿疱症の病態についてほとんど知られることのない、局所病変部での直接的な原因物質をとらえることができ、今後の研究の方向を示すことができた点において、非常に大きなものであったと思われる。さらにこの点からこの疾患の発症メカニズム及び病態解析に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 11 件)

1. 村上正基, 汗と湿疹. アレルギー・免疫 22 巻、3 号、2015、査読あり

2. Murakami M, et al, Cefcapene Pivoxil Hydrochloride Is a Potentially New Treatment for Palmoplantar Pustulosis with Pustulotic

Arthro-Osteitis.. *Dermatol*, Vol 231, No.4, 304-311, 2015. 査読あり

3. 村上正基 汗と掌蹠膿疱症. Monthly book derma、220巻、7号、79-83、2014、査読あり

4. Masuda M, Murakami M, et al, Case of palmoplantar pustulosis that developed with acute glomerulonephritis. *J Dermatol*, Vol.42, No.1, 111-112, 2014, 査読あり

5. Murakami M, et al, Vesicular LL-37 Contributes to Inflammation of the Lesional Skin of Palmoplantar Pustulosis *PLoS One*. Vol.9, No.10, e110677, 2014, 査読あり

6. Namba C, Murakami M, et al, Infantile generalized pustular psoriasis: Successful disease control with intermittent etretinate. *J Dermatol*, Vol.41, No.5, 403-406, 2014, 査読あり

7. Ishida-Yamamoto A, Furio L, Igawa S, Honma M, Tron E, Malan E, Murakami M, et al. Inflammatory peeling skin syndrome caused by homozygous genomic deletion in the PSORS1 region encompassing the CDSN gene. *Exp Dermatol*, Vol.23, No.1, 60-63, 2014, 査読あり

8. 村上正基、佐山浩二 掌蹠膿疱症：病態解明への新しいアプローチ. *愛媛医学*、32 巻、1 号、1-5、2013、査読あり

9. Harder J, Tsuruta D, Murakami M, Kurokawa I. What is the role of antimicrobial peptides (AMP) in acne vulgaris? *Exp Dermatol*, Vol.22, No.6, 386-391, 2013, 査読あり

10. Dai X, Okazaki H, Hanakawa Y, Murakami M, Mikiko Tohyama, Yuji Shirakata, Koji Sayama. Eccrine Sweat Contains IL-1 β , IL-1 α and IL-31 and Activates Epidermal Keratinocytes as a Danger Signal. *PLoS One*, Vol.8, No.7, e67666, 2013, 査読あり

11. Murakami M, et al. Acute generalised pustular bacterid. *Lancet Infect Dis*, Vol.13, No.8, 655-656, 2013, 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

1. Murakami M, et al, The Possible Treatment with Cefcapene Pivoxil Hydrochloride for Palmoplantar Pustulosis with Pustuloarthro-osteitis. 11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology,

2014. 11 月 12 日, (Heiderberg, Germany)

2. Murakami M, et al, Vesicular LL-37 contributes to inflammation of the lesional skin of palmoplantar pustulosis. Concurrent Sessions on 44th Annual ESDR Meeting, 2014. 9 月 12 日, (Copenhagen, Denmark)

3. Murakami M, et al, Human cathelicidin (hCAP18/LL37) in pustules contributes to the pathogenesis of palmoplantar pustulosis. International Investigative Dermatology Meeting, 2013, 5 月 9 日, (Edinburgh, UK)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村上 正基 (Murakami , Masamoto)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20278302

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

白方 裕二(Shirakata, Yuji)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：